植 物 分 类 与 资 源 学 报 2013, 35 (1): 33~40
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201312049

三种兜兰属植物种子发育过程及其与无菌萌发的关系*

张娟娟[1,2], 严 宁[1], 胡 虹[1**]
(1 中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术所重点实验室, 云南 昆明 650201;
2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 某些兰科植物的种子成熟前, 在无菌萌发过程中有较高的萌发率, 而成熟后萌发率急剧下降。本研究针对这一现象, 对三种兜兰属植物种子的发育过程进行了解剖学观察, 并对授粉后不同时期的种子进行无菌播种, 80 d 后统计其萌发率, 以探究种子发育过程中的解剖学特征与萌发率之间的关系。研究结果表明种胚刚发育到椭球形胚的时候, 胚柄尚存, 种皮细胞尚未皱缩, 此时三种兜兰的萌发率都能达到较高水平, 表明这是适合兜兰属植物萌发的最佳时期; 此后, 种皮开始皱缩, 木质素类物质积累导致种皮透水性下降, 推测这可能是导致其后期萌发率下降的主要因素之一。

关键词: 兜兰属; 种子发育; 无菌萌发; 解剖学

中图分类号: Q 945　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 2095-0845(2013)01-033-08

The Seed Development of Three *Paphiopedilum* Species in Relation to Asymbiotic Germination*

ZHANG Juan-Juan[1,2], YAN Ning[1], HU Hong[1**]
(1 *Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology*, *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650201, China; 2 *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: There is an optimum time for the asymbiotic germination of some species in Orchidaceae. A better understanding of the seed development would provide information for the germination events. The relationship between asymbiotic germination rate and the anatomical features in seed development of three *Paphiopedilum* species was studied. The highest frequency of seed germination was obtained when the embryo began to take an ellipsoidal shape, yet the seed coat had not dehydrated, and the suspensor cells were still present. After that, the parenchyma cell of the seed coat began to dehydrate and lignin substances accumulated, therefore lead to the down shift of the permeability of the seed coat, which maybe the main obstacles for the germination of the mature seeds of the *Paphiopedilum* species.

Key words: *Paphiopedilum*; Seed development; Anatomy; Asymbiotic germination

兜兰属 (*Paphiopedilum*) 隶属于兰科杓兰亚科 (Cypripedioideae), 是兰科中较原始的类群 (Cox 等, 1997; 刘仲健等, 2009)。目前共有 79 个野生种类记录在案, 其中约 1/3 产中国。就种类而论, 中国是世界上兜兰属植物最为丰富的国家, 达 27 种, 占兜兰属种类总数的三分之一 (刘仲健等, 2009)。兜兰属的显著特征之一即为唇瓣特化成兜状或拖鞋状, 故又称"拖鞋兰"或"仙履兰" (罗毅波等, 2005)。兜兰属植物以其奇特的花型, 丰富的花色和盛长的花期而广受兰花爱好者的关注与喜爱。但目前由于过度的人为采挖和生境破坏, 野外兜兰属植物资源濒临灭绝, 目前

* 基金项目: 云南省自然科学基金 (2009CD116), 中国科学院西部之光人才培养计划
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: huhong@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2012-04-09, 2012-08-17 接受发表
作者简介: 张娟娟 (1985-) 女, 硕士, 主要从事兰科植物形态和无菌萌发研究。E-mail: juanjuan_zhang@yeah.net

所有兜兰属植物均被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约（CITES)》附录Ⅰ。

为减轻野外采挖的压力，保护野生兜兰资源，同时满足人们观赏需求，迫切需要对兜兰属植物进行人工繁育。目前常用的繁育方法是利用其种子进行无菌萌发，从而获得实生苗。但一些兜兰属植物的种子同多数地生兰的种子一样，成熟后萌发通常十分困难（Arditti，1982；Rasmussen，1995）。一些研究发现，未成熟的兜兰种子在一定时期内较易萌发，且有较高萌发率，而晚于某个时期后种子萌发能力显著下降（Lee，2006；丁长春等，2004）。Yamazaki 和 Miyoshi（2006）对头蕊兰属 *Cephalanthera falcata* 的形态结构进行研究后认为在宽叶金兰内种皮的里面积累的木质素类物质可能是导致种子萌发率下降的原因，而 Lee 等（2005）对台湾杓兰的研究发现在种皮的内侧有脂类物质的存在，并认为脂类物质的存在也可能是导致种子萌发率下降的原因之一。本研究试图通过对三种兜兰种子发育过程的解剖学观察，探讨其与无菌萌发的萌发率之间的关系，并初步揭示种子成熟后期萌发率下降的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选取生长于中科院昆明植物研究所兰花温室的带叶兜兰（*P. hirsutissimum*）、卷萼兜兰（*P. appletonianum*）和杏黄兜兰（*P. armeniacum*）。其中，杏黄兜兰隶属于宽瓣亚属，具细长而横走的地下根状茎，5～7 枚叶，花纯黄色，花葶 15～28 cm，唇瓣深囊状，近椭圆状球形或宽椭圆形，花期 3–5 月；带叶兜兰隶属于兜兰亚属，叶 4～6 枚，花葶 20～30 cm，唇瓣囊盔状，花期 4–5 月；卷萼兜兰也隶属于兜兰亚属，叶 4～8 枚，花葶 17～60 cm，唇瓣囊盔状，花期 1–5 月。

1.2 果荚采集

2011 年 3–5 月间，对开花的三种兜兰进行授粉，分别于授粉后 50 d、70 d、90 d、110 d、130 d、140 d、160 d、180 d，随机摘取兜兰果荚（各种每个时期采 2～3 个）作为实验材料，且分别记为 50DAP（Days After Pollination）、70DAP、90DAP、110DAP、130DAP、140DAP、160DAP、180DAP。

1.3 无菌播种

用肥皂水刷洗果荚，再用 0.1% 升汞溶液和 75% 酒精溶液对果荚进行两次消毒，酒精灯略微灼烧果荚后，取出种子播种于改良的 Harvais 培养基上，于 25 ℃暗培养，每个时期的果荚播种 5 瓶。播种 80 d 后，从培养基上随机取出 2 个 1 cm×1 cm 的琼脂块，统计萌发率，用 SPSS16.0 软件（SPSS Inc.，Chicago，USA）进行统计分析，并用 sigmaplot10.0 软件（Systat SoftwareInc.，city，USA）作图。

1.4 胚发育过程的形态观察

从三种兜兰授粉后各个时期的果荚中取部分种子，浸泡于改良的 FAA 固定液中 24 h 以上。用 50% 至 100% 的酒精脱水，之后在 GMA（乙二醇甲基丙烯酸酯）混合液中浸透并包埋，于 60 ℃温箱中聚合 10 h。用 LEICA RM2126RT 转轮式切片机切片，切片厚度为 5 μm。部分切片以 0.5% 的甲苯胺蓝染液染色，用 LEICA DM1000 显微镜观察并照相；另取一部分切片用 0.5 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的尼罗红染色 1 min，去离子水冲洗 3 次后用 2 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的 DAPI 染色 1 min，用 OLYMPUS FV1000 激光共聚焦扫描显微镜观察并照相。

2 结果与分析

2.1 三种兜兰属植物种子萌发率的统计

卷萼兜兰与带叶兜兰的种子在 50DAP 和 70DAP 时不能萌发，此后萌发率逐渐上升，萌发率均在 130DAP 时达到最高（卷萼兜兰为 72.5%，带叶兜兰为 78.7%）。此后萌发率逐步下降，180DAP 的种子萌发率接近于 0。杏黄兜兰的种子在 70DAP 时有少量萌发，到 90DAP 时萌发率达到最高（71.6%）此后萌发率下降，140DAP 后的种子萌发率已经接近于 0（图 1）。

2.2 三种兜兰的种子发育过程

2.2.1 兜兰胚发育过程

2.2.1.1 卷萼兜兰的胚发育过程 50DAP 时，卷萼兜兰的胚囊尚未形成，珠心内的大孢子母细胞正在进行减数分裂，形成大孢子，珠被细胞不断生长包裹珠心（图 2：A）。70DAP 的时候，卷萼兜兰的大孢子经过有丝分裂形成了成熟胚囊（图 2：B）。90DAP 时，卷萼兜兰的绝大多数胚囊都已经完成了受精作用，受精形成的合子呈狭长型，有明显的极性分化，细胞核及大部分细胞质位于合子的合点端（图 2：C）。合子经过第一次不均等的横分裂，产生较小的顶细胞和较大的基细胞，基细胞经过几次横分裂衍生出的细胞形成胚柄（图 2：D–G）。110DAP 时，在卷萼兜兰的胚囊中观察到圆球形的原胚，胚柄为呈直线型

排列的 2 ~3 个细胞（图 2：D）。随后圆球形胚在纵轴方向延伸，在 130DAP 的种子切片中可以观察到椭球形胚（图 2：E），140DAP 的椭球形胚中胚柄为呈直线型排列的 5 个细胞（图 2：F）。160DAP 的种子中，椭球形胚已经几乎填满整个胚囊，胚柄也开始皱缩（图 2：G）。到 180DAP 时，胚柄已经完全消失，椭球形的胚细胞数目不足百个，但已经有了简单的组织分化：胚最外面是一层排列较规则的长方形细胞，为原表皮；靠近合点端的细胞较小，而靠近珠孔端的细胞较大，珠孔端细胞直径约是合点端细胞直径的 2 倍（图 2：H）。

2.2.1.2　带叶兜兰的胚发育过程　带叶兜兰的胚发育过程与卷萼兜兰大致相同，同样由受精后的合子（图 3：A）经过横分裂形成大小不等的两个细胞（图 3：B），然后经由四细胞原胚（图 3：C），早期的圆球形胚（图 3：D，E）发育到晚期的椭球形胚（图 3：F，G），胚柄消失，种皮皱缩，形成成熟种子（图 3：H）。成熟的带叶兜兰种胚与卷萼兜兰一样也有原表皮的分化（图 3：H），但带叶兜兰授粉到受精之间的时间间隔较卷萼兜兰短，不到 70 d。在 70DAP 时带叶兜兰的胚囊中已经完成受精作用，并开始第一次的横分裂，胚柄细胞数也较卷萼兜兰少，一般为 2 ~4。

2.2.1.3　杏黄兜兰的胚发育过程　杏黄兜兰的胚发育过程与卷萼兜兰和带叶兜兰类似，但比二者快。50DAP 内，完成了胚囊发育及受精作用（图 4：A）。70DAP 时，已有圆球形胚出现（图 4：B），90DAP 时，已形成椭球形胚（图 4：C）。

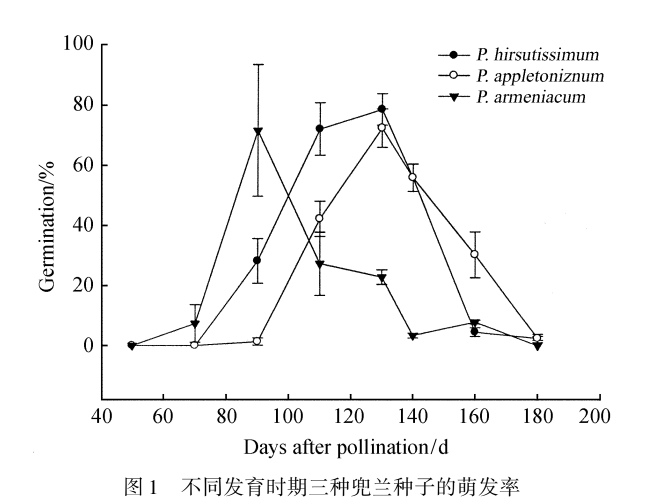


图 1　不同发育时期三种兜兰种子的萌发率

Fig. 1　Mean percent germination of *Paphiopedilum* spp. seeds collected at different developmental stages

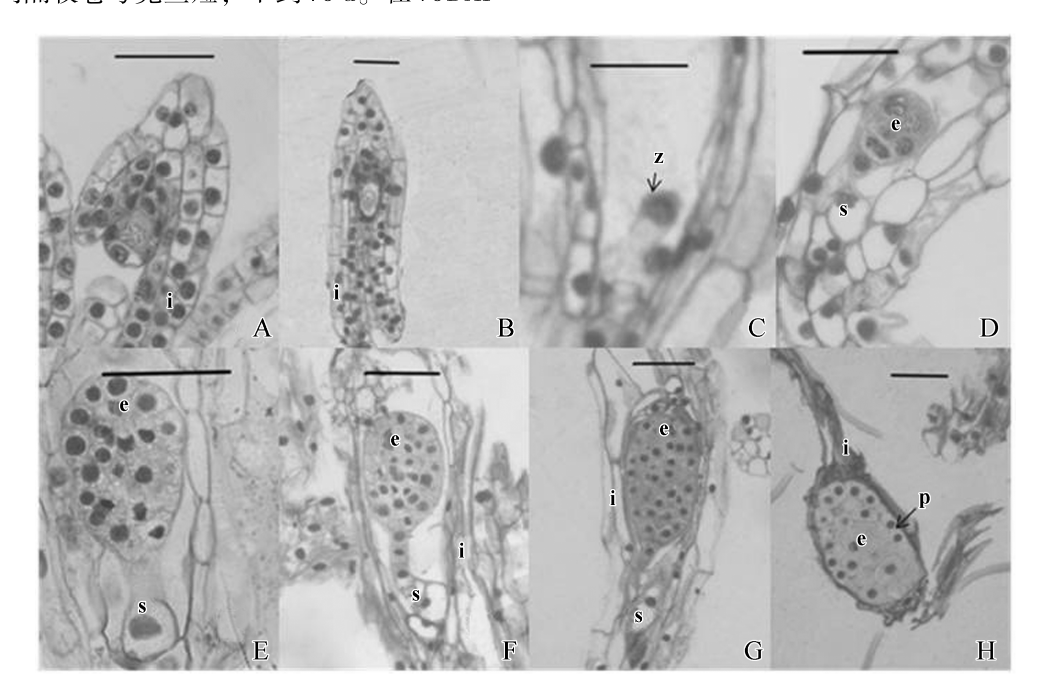


图 2　卷萼兜兰授粉后胚珠及种子的发育过程（标尺 = 50 μm）

Fig. 2　Embryo sac formation and embry development of *P. appletoniamum* (bar = 50 μm)

A. 50DAP；B. 70DAP；C. 90DAP；D. 110DAP；E. 130DAP；F. 140DAP；G. 160DAP；H. 180DAP

i. integument；z. zygote；e. embryo；s. suspensor；p. protoderm

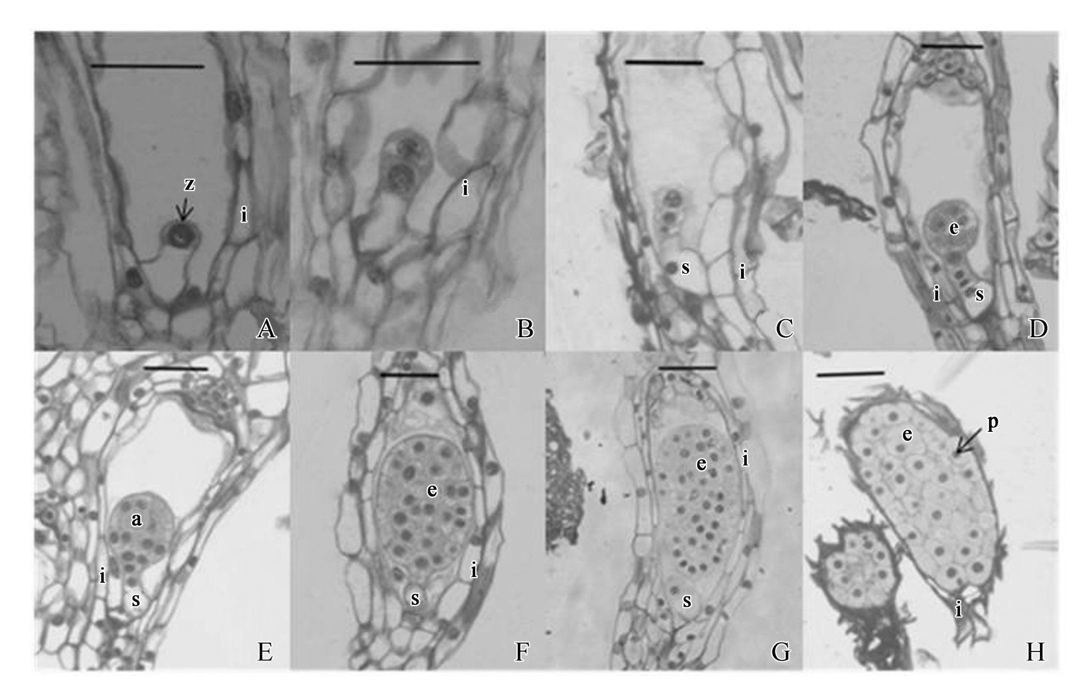


图3 带叶兜兰种子发育过程（标尺=50 μm）

Fig. 3 Embryo development of *P. hirsutissimum* (bar=50 μm)

A. 70DAP; B. 90DAP; C. 90DAP; D. 110DAP; E. 110DAP; F. 130DAP; G. 140DAP; H. 180DAP

i. integument; z. zygote; e. embryo; s. suspensor; p. protoderm

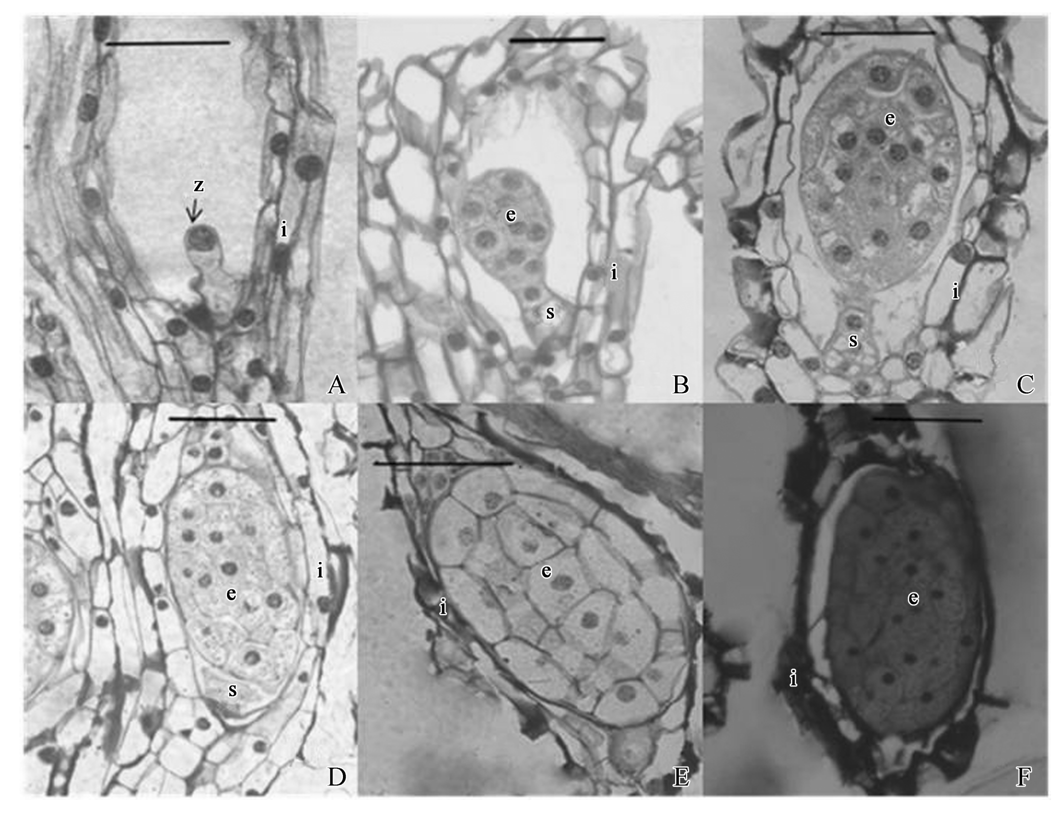


图4 杏黄兜兰种子发育过程（标尺=50 μm）

Fig. 4 Embryo development of *P. armeniacum* (bar=50 μm)

A. 50DAP; B. 70DAP; C. 90DAP; D. 110DAP; E. 140DAP; F. 180DAP; i. integument; z. zygote; e. embryo; s. suspensor

110DAP 时，大部分种子的胚柄均严重退化，椭球形胚填满整个胚囊（图 4：D）。140DAP 以后种皮已经皱缩成紧贴种胚的一层（图 4：E，F）。成熟的杏黄兜兰种子分化程度不及卷萼兜兰和带叶兜兰的高，虽然也有原表皮的分化，但原表皮之内合点端与珠孔端的细胞大小较为均一。

2.2.2　兜兰种皮木质素累积过程

杏黄兜兰种皮在发育初期由两层薄壁细胞组成（图 5：A），当胚发育到圆球胚时期，种皮外层细胞的径向壁和内切向壁上开始有次生增厚，增厚部分呈马蹄形（图 5：B，C），染色显示有木质素类物质。到 130DAP 之后，种皮薄壁细胞开始脱水皱缩，形成致密一层紧贴种胚外面（图 5：D）。

卷萼兜兰和带叶兜兰的种皮同样由两层液泡化的薄壁细胞组成（图 6：A）。当胚呈圆球形之时，外层种皮的径向壁和内切向壁上开始有马蹄形次生增厚，木质素类物质开始积累（图 6：B，D），到 180DAP 之时，两层种皮细胞均已完全皱缩，紧贴种胚（图 6：C，F）。

2.2.3　兜兰种皮脂类物质的动态变化过程

50DAP 的卷萼兜兰切片中，尼罗红荧光染料显示为阴性，表明在胚囊形成前，珠心细胞及珠被细胞上均无脂类物质积累（图 7：A），70DAP 时，胚囊发育完成，在胚囊与种皮内层细胞之间出现一层脂类物质（图 7：B）。在胚发育的较早时期，种皮内侧胚囊之外始终能看到脂类物质的存在，该层脂类物质主要积累在胚囊两侧，在胚囊的合点端与珠孔端不甚明显（图 7：C）。到胚发育后期，种皮皱缩之后，脂类物质几乎消失（图 7：D）。

如图 8 和图 9 所示，在带叶兜兰和杏黄兜兰中有同样的规律，胚发育较早时期能够在胚囊与种皮内层细胞之间看到脂类物质的积累，到胚发育成熟且种皮完全皱缩之后，该层脂类物质消失。

2.3　三种兜兰种子发育阶段与无菌萌发率之间的关系

结合三种兜兰种子发育的阶段与其萌发率，我们发现用 DAP（授粉后天数）来计量，三种种子中杏黄兜兰的萌发高峰最早出现，约在 90DAP 时；而另外两种兜兰的萌发高峰则出现较晚，约在 130DAP 时。但将每种兜兰的种子发育过程与种子萌发情况进行比较，发现具有一定的相似性：在合子最初形成之时，种子在无菌萌发培养基中不能成功萌发，而随着合子的发育，在 2～4 细胞原胚及早期圆球形胚阶段，就能有一定程度的萌发，当种子由圆球形胚纵向延伸形成椭球形胚之时，三种兜兰都有最高的萌发率。此后虽然椭球形胚仍在分裂生长，但胚柄细胞已经开始退化，种皮开始皱缩，萌发率也随之下降。到后期，种皮完全皱缩，在无菌萌发实验中，种子基本不能萌发。

3　讨论

本文研究了三种兜兰种子发育过程中的解剖学特征，比较了种子不同发育时期的萌发率。结果表明，三种兜兰种子的发育过程中萌发率都有一个高峰期，高峰期过后萌发率逐渐下降，成熟的种子很难萌发。结合其他学者进行的兜兰属植

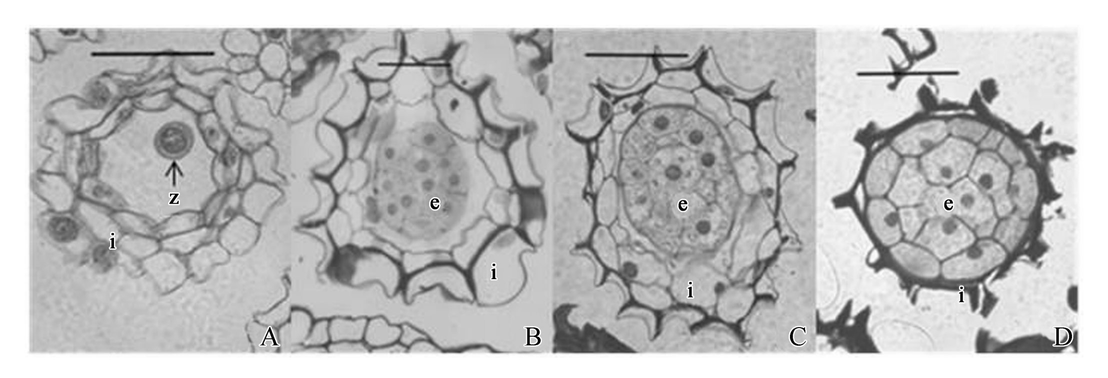


图 5　杏黄兜兰种皮的变化情况（标尺 = 50 μm）

Fig. 5　Changes in the integumentary tissues of *P. armeniacum* (bar = 50 μm)

A. 50DAP；B. 70DAP；C. 90DAP；D. 130DAP；i. integument；z. zygote；e. embryo

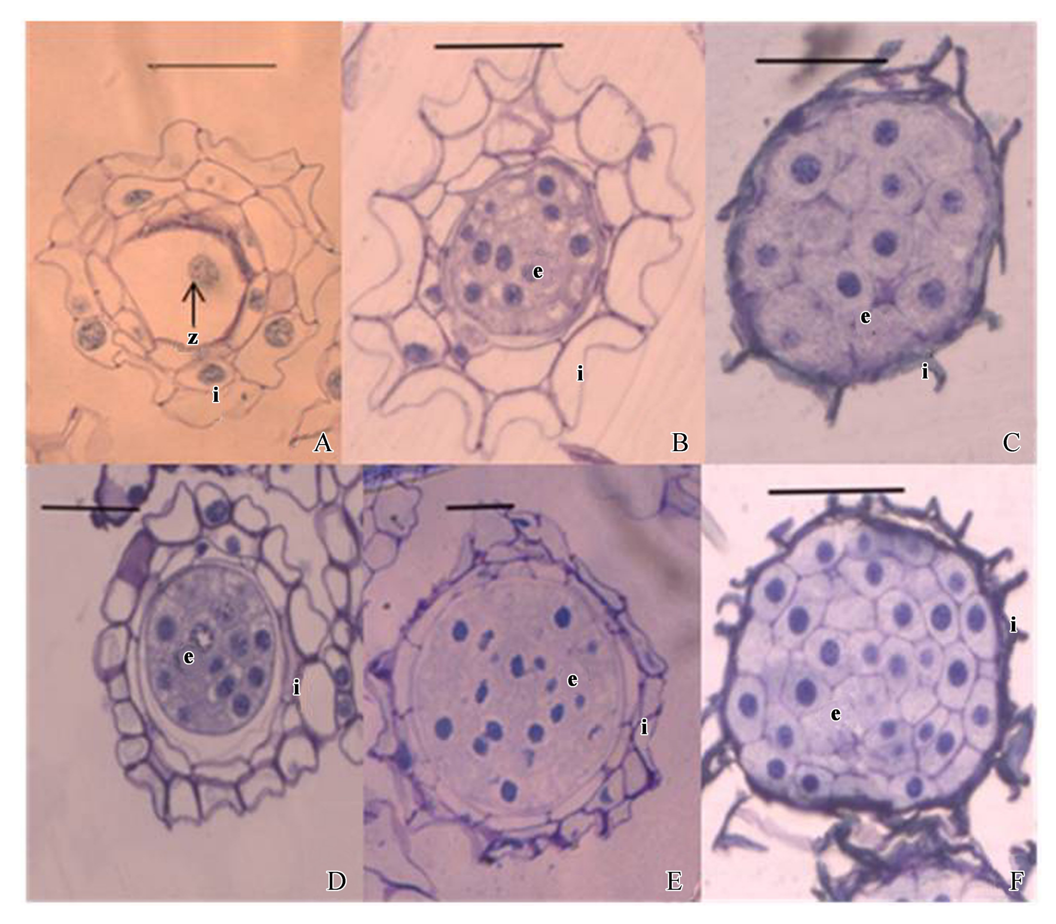


图6 卷萼兜兰和带叶兜兰的种皮变化情况（标尺=50 μm）

A–C. 卷萼兜兰，A. 90DAP；B. 130DAP；C. 180DAP；D–F. 带叶兜兰，D. 110DAP；E. 140DAP；F. 180DAP

Fig. 6 Changes in the integumentary tissues of *P. appletoniacmum* and *P. hirsutissimum* (bar=50 μm)

A–C. *P. appletoniacmum*, A. 90DAP; B. 130DAP; C. 180DAP; D–F. *P. hirsutissimum* D. 110DAP; E. 140DAP; F. 180DAP;

i. integument; z. zygote; e. embryo

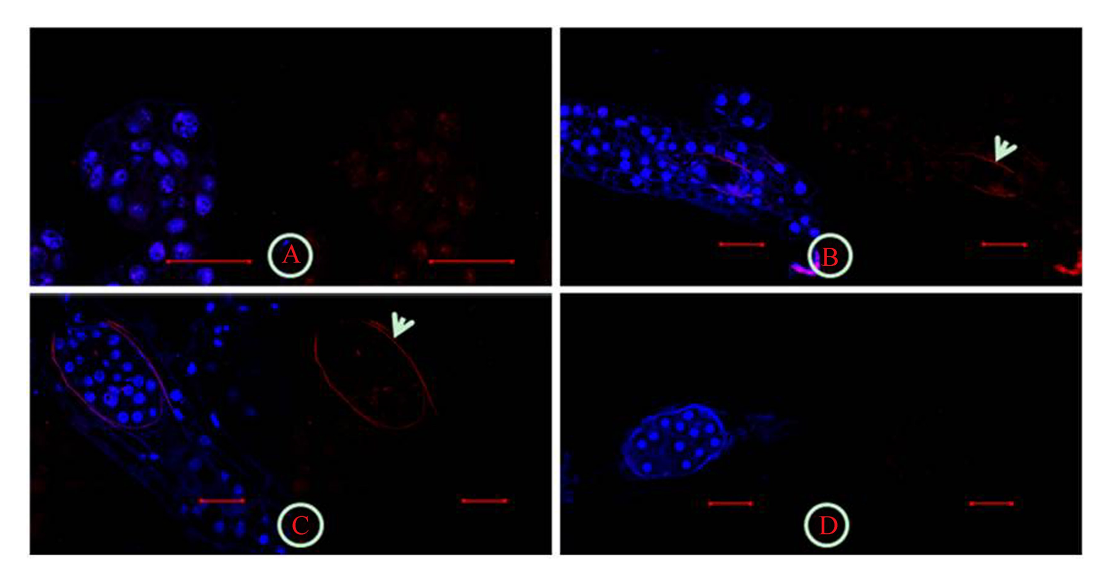


图7 卷萼兜兰胚囊外脂类物质的变化（红色；标尺=50 μm）

Fig. 7 Nile red staining showing the changes of cuticle material on the embryo sac of *P. appletoniacmum* (bar=50 μm)

A. 50DAP; B. 70DAP; C. 160DAP; D. 180DAP

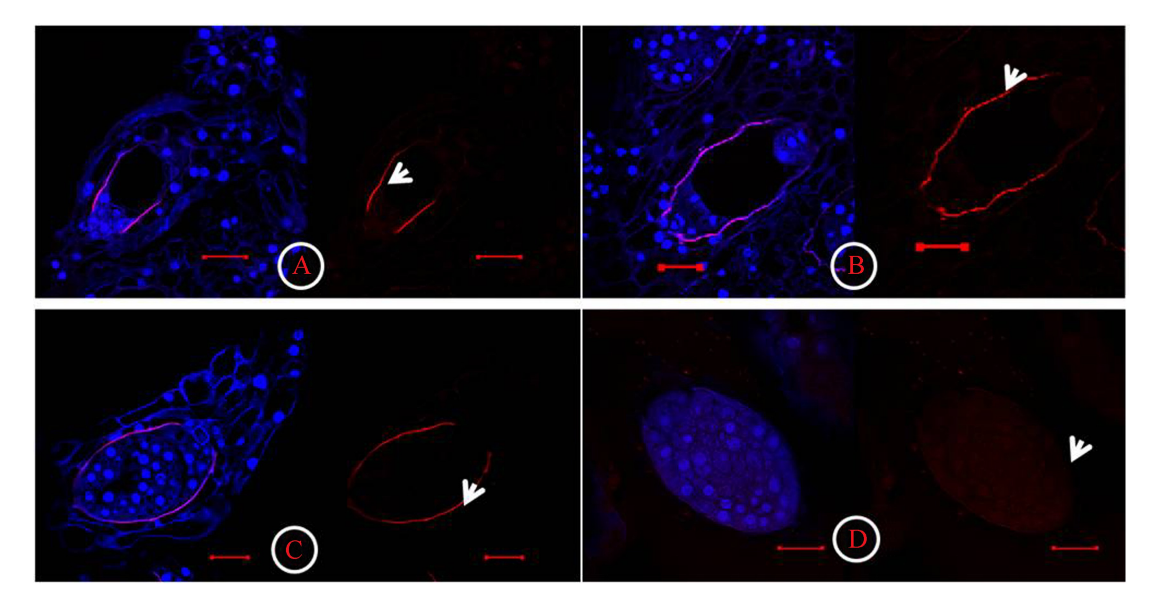


图 8　带叶兜兰胚囊外脂类物质的变化（标尺 = 50 μm）

Fig. 8　Nile red staining showing the changes of cuticle material on the embryo sac of *P. hirsutissimum*（bar = 50 μm）

A. 70DAP；B. 90DAP；C. 130DAP；D. 180DAP

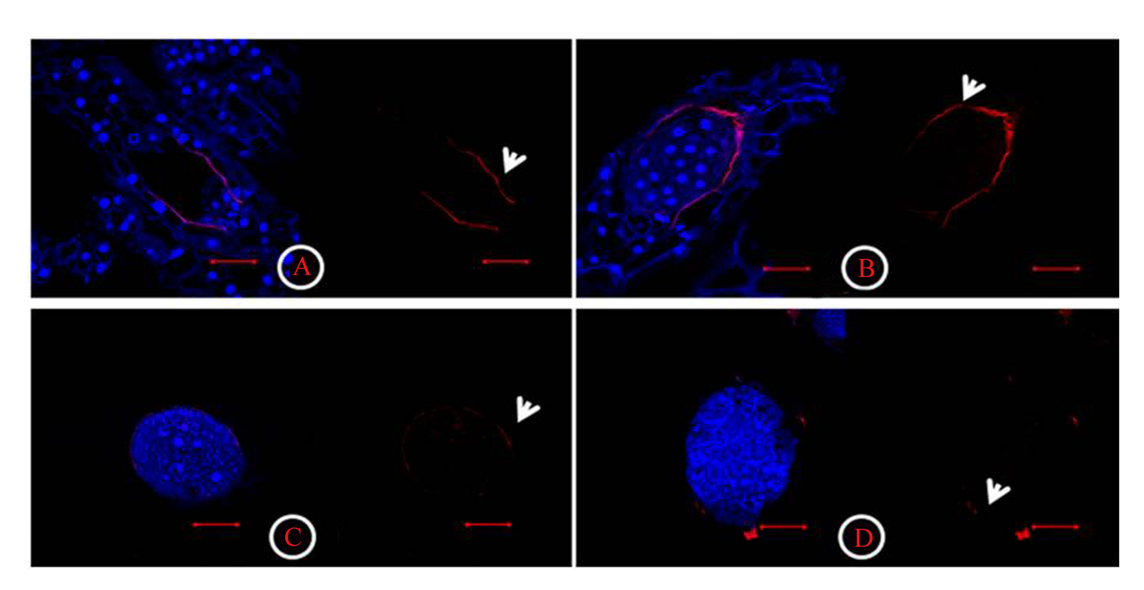


图 9　杏黄兜兰胚囊外脂类物质的变化（标尺 = 50 μm）

Fig. 9　Nile red staining showing the changes of cuticle material on the embryo sac of *P. armeniacum*（bar = 50 μm）

A. 50DAP；B. 90DAP；C. 110DAP；D. 180DAP

物种子的无菌萌发研究，发现硬叶兜兰（*P. micranthum*）（陈之林等，2004）、巨瓣兜兰（*P. bellatulum*）、古德兜兰（*P. godefroyae*）、海伦兜兰（*P. helenae*）和亨利兜兰（*P. henryanum*）、白旗兜兰（*P. spicerianum*）及雪白兜兰（*P. niveum*）（Lee，2007）等种子中均存在最佳萌发时期过后种子萌发率下降的问题，因而我们推测，兜兰属中可能普遍存在这种成熟种子萌发困难，而未成熟种子萌发率高于成熟种子的现象。

目前对兜兰的近缘属杓兰属的种子发育阶段与萌发率之间关系有部分研究，Lee 等（2005）对台湾杓兰的研究认为在 90 ~ 105DAP 时，种胚发育到带有单细胞胚柄的早期球形胚至球形胚时，种子的萌发率最高。依据我们的研究，在兜兰属中萌发率最高的时候，是在果荚中多数种胚处于椭球形，且胚柄尚未退化，种皮未完全皱缩之时。

台湾杓兰（*Cypripedium formosanum*）、大花杓兰（*C. macranthos*）的胚囊外一般有两层珠被，外珠被发育成外种皮，而内珠被发育成含有脂质的壳（carapace）。成熟时，这层壳质紧紧贴在胚的外面，并被认为是导致成熟后种子萌发困难的原因之一（Lee，2005；张毓等，2010）。但据本研究以及任玲和王伏雄（1987）对古德兜兰（*P. godefroyae*）种子解剖形态的观察发现，兜兰的种皮不同于杓兰，是由一层珠被发育而来的单种皮，因而不存在内外种皮之分。故在本研究中观察到的脂类物质的来源与杓兰中由内种皮发育而来的脂类物质不同，其命运也不尽相同。这层物质在胚囊形成伊始便出现，在种子成熟的后期逐渐消失或者减少。因而我们认为，兜兰属的种子中这层脂类物质可能与种子成熟后期萌发率下降没有必然联系，其主要的生理学意义可能是为胚的发育创造稳定的环境条件，待胚发育完善后，便消失了。兜兰成熟种子萌发率下降的主要原因可能是种子成熟后期木质素类物质的积累，导致种子透水性下降。在野外环境中，兜兰这种高度木质化的种皮一方面能够保护幼嫩的种胚，免受机械伤害；另外一方面，还能保持兜兰种胚的水分，防止其在环境中脱水死亡，使兜兰属植物的种子能够在恶劣的环境下存活。在适宜的条件下，相应的共生真菌侵染种子，才能使得种子成功萌发。此外，在种子成熟后期是否有抑制种子萌发的激素类物质累积从而导致休眠，尚有待进一步的研究。

致谢 中科院昆明植物研究所梁汉兴研究员在结果分析上给予的耐心指导和提出宝贵建议，台湾自然科学博物馆李勇毅博士在文献上提供帮助。

〔参 考 文 献〕

刘仲健，陈心启，陈利君等，2009．中国兜兰属植物［M］．北京：科学出版社，10—12

Arditti J，Clements G，Fast G *et al.*，1982．Orchid seed germination and seedling culture—a manual［A］．In：Arditti J（ed.），*Orchid Biology：Reviews and Perspectives*［M］．New York：Comstock Publishing Associates，244—370

Chen ZL（陈之林），Ye XL（叶秀粦），Liang CY（梁承邺）*et al.*，2004．Seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*［J］．*Acta Horticulturae Sinica*（园艺学报），**31**（4）：540—542

Cox AV，Pridgeon AM，Alber VC *et al.*，1997．Phylogenetics of the slipper orchids（*Cypripedioideae*，Orchidaceae）nuclear rDNA ITS sequences［J］．*Plant Systematics and Evolution*，**208**（3-4）：197—223

Ding CC（丁长春），Yu H（虞泓），Liu FY（刘方媛），2004．Factors affecting the germination of *Paphiopedilum armeniacum*［J］．*Acta Botanica Yunnanica*（云南植物研究），**26**（6）：673—677

Lee YI，Lee N，Yeung EC *et al.*，2005．Embryo development of *Cypripedium formosanum* in relation to seed germination *in vitro*［J］．*Journal of the American Society for Horticultural Science*，**130**（5）：747—753

Lee YI，Yeung EC，Lee N，2006．Embryo development in the lady's slipper orchid，*Paphiopedilum delenatii*，with emphasis on the ultrastructure of the suspensor［J］．*Annals of Botany*，**98**（6）：1311—1319

Lee YI，2007．The asymbiotic seed germination of six *Paphiopedilum* species in relation to the time of seed collection and seed pretreatment［J］．*Acta Horticulturae*，**755**：381—386

Luo YB（罗毅波），Jia JS（贾建生），Wang CL（王春玲），2003．Conservation strategy and potential advantages of the Chinese *Paphiopedilum*［J］．*Biodiversity Science*（生物多样性），**11**（6）：491—498

Rasmussen HN，1995．*Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant*［M］．New York：Cambridge University Press

Ren L（任玲），Wang FX（王伏雄），1987．Embryological study of *Paphiopedilum godefroyae* Stein［J］．*Acta Botanica Sinica*（植物学报），**29**（1）：14—21

Yamazaki J，Miyoshi K，2006．In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata*（Orchidaceae）［J］．*Annals of Botany*，**98**：1197—1206

Zhang Y（张毓），Zhang QX（张启翔），Zhao SW（赵世伟）*et al.*，2010．Embryo and integument development of the endangered species *Cypripedium macranthos* Sw［J］．*Acta Horticulturae Sinica*（园艺学报），**37**（1）：72—76